

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 3835237 C1

⑤1 Int. Cl. 4
A61L 15/00
A 61 L 27/00
C 14 C 1/00

②1 Aktenzeichen. P 38 35 237 0-45
②2 Anmeldetag. 15 10 88
④3 Offenlegungstag. —
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung. 28 12. 89

DE 3835237 C1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:

B. Braun Melsungen AG, 3508 Melsungen, DE

⑦4 Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

⑦2 Erfinder:

Scholl, Edmund, Dr.; Waldert, Helmut, 3508
Melsungen, DE, Beyer, Helmut, 3507 Baunatal, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 30 34 273 A1
US 45 02 159
US 40 66 083

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Rinder-Pericard-Materialien und ihre Verwendung

Offenbart wird ein Verfahren zur Herstellung von Rinder-Pericard-Material durch Verarbeitung von rohem Rinder-Pericard-Gewebe über eine naßchemische Aufbereitung, oxidative Bleichung, Auswaschen, Entfetten, Trocknen und Sterilisieren, bei dem das im Rinder-Pericard enthaltene Kollagen durch eine bestimmte Abfolge von Verfahrensschritten aufgearbeitet wird.

Das mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltene Rinder-Pericard-Material kann in vorteilhafter Weise für Implantate und Transplantate in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden.

DE 3835237 C1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Rinder-Pericard-Materialien, die eine ausgezeichnete Biokompatibilität sowie eine erhöhte Stabilität besitzen, und die Verwendung der so hergestellten Materialien als Transplantate oder Implantate in der Humanmedizin und Veterinärmedizin.

Seit Anfang dieses Jahrhunderts versucht man in der Chirurgie größere Gewebsdefekte mit Hilfe von Transplantaten aus kollagenem Bindegewebe zu decken (Marchant, 1901; Kleinschmidt, 1914). Seit 1954 steht humane Dura mater als homologes Transplantat in lyophilisierter Form, seit 1973 in Form eines lösungsmittelgetrockneten Produkts zur Verfügung. In vielen Fällen hat sich Humandura dank ihrer guten Gewebeträgbarkeit, des Fehlens immunologischer Reaktionen und nicht zuletzt wegen der hohen Reißfestigkeit bewährt, so daß dieses Biomaterial auch heute noch mit Erfolg eingesetzt wird. Leider steht Dura mater als Human-Transplantat aber nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung und kann daher den Bedarf seitens der Chirurgie bei weitem nicht decken. Auch gibt es einige Indikationen, zum Beispiel in der Neurochirurgie und im HNO-Bereich, bei denen sich Dura-Transplantate häufig als etwas zu steif und von der Dicke her nicht optimal erwiesen haben.

Die DE-OS 30 34 273 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Kollagen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß natürliches, unlösliches Kollagen mit einer wäßrigen Lösung eines Alkalisulfats und/oder Alkalihydroxids behandelt wird, daß man das fettfreie Kollagen mit einer wäßrigen Lösung, die ein Alkalisulfat enthält, behandelt und gegebenenfalls mit destilliertem Wasser wäscht, das Kollagen in einer wäßrigen Lösung löst, der Lösung gegebenenfalls eine kleine Menge einer biologisch wirksamen Substanz, wie ein Antibiotikum, ein Hormon oder ein Spermizid, zusetzt, diese Lösung einfriert und das Produkt unter Vakuum trocknet.

Allerdings nimmt diese Offenlegungsschrift den Gegenstand der vorliegenden Erfindung weder in allen Merkmalen vorweg noch legt sie diesen für den Fachmann nahe.

Das US-Patent 40 06 083 beschreibt ein steriles, in der Chirurgie einsetzbares Kollagenprodukt mit einer Filz- oder Webpelzstruktur, welches eine hämostatische Wirkung ausübt, eine hohe Absorptionskapazität für Körperflüssigkeiten besitzt, die Zellregeneration anregt, ein hohes Resorptionsvermögen aufweist, im wesentlichen nicht von Körpergeweben abgestoßen wird und das optimale mechanische Eigenschaften besitzt, was dieses Material dazu befähigt, bei der Versorgung von Hautverletzungen oder in Hautverletzungen oder in Knochenhöhlungen eingesetzt zu werden.

Allerdings nimmt die Lehre dieses US-Patents den Gegenstand der vorliegenden Erfindung weder in allen Merkmalen vorweg, noch legt sie diesen nahe.

Das US-Patent 45 02 159 beschreibt die Herstellung einer röhrenförmigen Prothese, wie beispielsweise ein Gefäß oder eine Harnleiterprothese. Diese wird durch Zusammennähen der entgegengesetzten Ecken eines Pericardgewebes mit einem biokompatiblen Faden hergestellt. Es wird eine exakte Beschreibung beim Vorgehen des Nähens angegeben. Vorzugsweise verwendet man Pericard vom Rind, das ähnliche Dehnbarkeiten wie humane Gewebe besitzt. Das röhrenförmige Gewebe wird nach dem Vernähen für 7 Tage in einer 0,5%igen Glutardialdehyd-Lösung gegerbt. Die glatte

Seite des Pericardgewebes befindet sich im Lumen, die Basalmembranen auf der Oberfläche. Sterilisation erfolgt durch Konservierung in Formalin bzw. mit Strahlensterilisation einer das Pericard enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung.

Allerdings gibt dieses US-Patent keine Hinweise über die Isolierung, Reinigung bzw. die physikalischen und chemischen Eigenschaften der so hergestellten röhrenförmigen Prothese, so daß der Gegenstand des US-Patents den Gegenstand der vorliegenden Erfindung nicht nahelegen kann.

Aus diesen Gegebenheiten des Standes der Technik resultierte zwangsläufig der Wunsch, ein praktisch unbegrenzt verfügbares Transplantat bzw. Implantat bereitzustellen, das möglichst alle positiven Eigenschaften der Dura mater in sich vereinigt und darüber hinaus noch gewisse Vorteile bei der Handhabung bietet. Zusätzlich sollte gewährleistet sein, daß keine für den Menschen gefährlichen Keime (HIV-Viren, Hepatitis-Viren etc.) durch das Rohmaterial eingeschleppt werden konnten, wie dies bei humanen Transplantaten grundsätzlich möglich ist.

Unter Berücksichtigung aller produktrelevanten Parameter wurde in bovinem Pericard — im folgenden auch Pericard genannt — ein biologisches Material gefunden, das als Implantat zur Deckung humaner Gewebsdefekte in nahezu optimaler Weise den Anforderungen genügt.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung von Rinder-Pericard-Materialien zu schaffen, bei dem die biologische Kompatibilität und Stabilität des hierbei erhaltenen Erzeugnisses verbessert wird. Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung neuer Verwendungsmöglichkeiten für dieses Erzeugnis.

Bei experimentellen Untersuchungen wurde nun überraschend gefunden, daß durch ein modifiziertes Herstellungsverfahren die Resistenz der im Rinder-Pericard enthaltenen Skleroproteine gegen biologischen Abbau sowie ihre Biokompatibilität auch ohne Aldehyd-Gerbung mittels Formaldehyd oder Glutardialdehyd — wie dies in US-A 45 02 159, WO 84/04 669 sowie US-A 44 56 589 beschrieben ist — gesteigert werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von Rinder-Pericard-Material durch Aufarbeitung von rohem Rinder-Pericard-Gewebe durch eine naßchemische Aufbereitung, oxidative Bleichung, Auswaschen, Entfetten, Trocknen und Sterilisieren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die naßchemische Aufbereitung des Rinder-Pericard-Gewebes folgende Schritte umfaßt:

- a) Wässern des Rinder-Pericard-Gewebes,
- b) mechanische Entfernung von Fettgewebe und Basalmembranen von der Oberfläche des Rinder-Pericard-Gewebes,
- c) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit einer verdünnten, wäßrigen, basischen Lösung,
- d) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von restlicher Base,
- e) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit verdünnter wäßriger Natriumchloridlösung,
- f) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von Natriumchloridresten,
- g) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit

einem Komplexierungsmittel.

h) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von Komplexierungsmittelresten.

i) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit einem sauren Puffersystem und

j) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von sauren Puffersystemresten

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wiederholt man im Anschluß an Verfahrensschritt d) vor Verfahrensschritt e) die Maßnahme nach Merkmal b).

Obgleich die vorstehend beschriebenen Maßnahmen im naßchemischen Aufbereitungsschritt ohne weiteres auch oberhalb von Raumtemperatur oder unterhalb von Raumtemperatur durchgeführt werden können, so ist es doch im Sinne der vorliegenden Erfindung bevorzugt, sämtliche naßchemischen Verfahrensschritte bei Raumtemperatur, also zwischen 15°C und 25°C durchzuführen.

Vorzugsweise wird die Behandlung im Verfahrensschritt c) in einer verdünnten, wäßrigen, basischen Lösung von Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Lithiumhydroxid und/oder Natriumcarbonat durchgeführt. Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer 2 bis 2,5 Gew.-%igen wäßrigen Natriumhydroxidlösung, welche im allgemeinen über einen Zeitraum bis zu 16 Stunden auf das Rinder-Pericard-Gewebe einwirken soll, wobei man pro 100 g Rinder-Pericard-Gewebe 0,50 bis 1,00 l der verdünnten basischen Lösung verwendet. Hierdurch wird einerseits ein guter Reinigungseffekt erreicht, der eine möglichst vollständige Inaktivierung von Enzymen und potentiellen Keimen einschließt, andererseits aber auch eine Schädigung des kollagenhaltigen Gewebes vermieden.

Nach der Behandlung mit der verdünnten, wäßrigen, basischen Lösung ist das Rinder-Pericard-Gewebe im allgemeinen stark auf das 2- bis 5fache des Ursprungsvolumens aufgequollen.

Vorzugsweise wird die Behandlung im Verfahrensschritt e) mit einer 10 bis 11 Gew.-%igen Natriumchloridlösung ausgeführt, wodurch ein für die weitere Verarbeitung günstiger Quellzustand des Kollagens eingestellt werden kann. Niedrigere Konzentrationen an Natriumchloridlösungen bewirken demgegenüber eine nur unzureichende Entquellung des nach der alkalischen Behandlung stark gequollenen Kollagens. Höhere Konzentrationen an Natriumchloridlösung würden das Rinder-Pericard-Material nur unnötig mit Salzresten anreichern und sind schon deshalb nicht sinnvoll.

Vorzugsweise wird die Behandlung im Verfahrensschritt g) mit einem dem Fachmann bekannten Komplexierungsmittel für die Komplexierung mehrwertiger Metallionen, die zum Teil proteingebunden vorliegen, durchgeführt. Als besonders bevorzugt hat sich in diesem Falle eine Dinatrium-EDTA-Lösung erwiesen, welche beispielsweise in einer Konzentration von 0,3 bis 0,5 Gew.-% vorliegt. Dieses Komplexierungsreagenz muß, um seine komplexierende Wirkung voll entfalten zu können, auf einen basischen pH-Wert von mehr als 11 eingestellt werden. Die Behandlung mit dem Komplexierungsmittel sollte im allgemeinen über einen Zeitraum von 0,5 bis 2 h durchgeführt werden.

Vorzugsweise setzt man die Spülung im Verfahrensschritt h) so lange fort, bis man einen schwach-alkalischen pH-Wert von maximal 8,5 erreicht hat.

Vorzugsweise setzt man für die Behandlung im Verfahrensschritt i) als saures Puffersystem ein Acetat-Puffersystem mit einem pH-Wert von 4,5 bis 6,0 ein.

Vorzugsweise wird der nach der naßchemischen Aufbereitung folgende Schritt der oxidativen Bleichung in der Art ausgeführt, daß man das Rinder-Pericard-Gewebe mit einer wasserstoffperoxidhaltigen wäßrigen Lösung mit einem Gehalt von weniger als 2 Gew.-%, insbesondere um 1,5 Gew.-% vornimmt. Diese Bleichung mittels Wasserstoffperoxid dient dem Zweck, noch vorhandene Begleitstoffe des Kollagens oxidativ zu zerstören, ohne das Kollagen selbst anzugreifen. Es hat sich gezeigt, daß Konzentrationen von Wasserstoffperoxid oberhalb 2,0 Gew.-% im Sinne der Erfindung nicht geeignet sind, da diese bereits eine merkliche Schädigung des kollagenhaltigen Rinder-Pericard-Gewebes bewirken. Die Wasserstoff-Peroxid-Behandlung wird im allgemeinen über einen Zeitraum von 0,5 bis 2 Stunden durchgeführt, wobei man pro 100 g Rinder-Pericard-Gewebe 0,5 bis 1,0 l Wasserstoffperoxidlösung verwendet.

Im Anschluß an diese oxidative Bleichung werden Wasserstoffperoxidreste durch erschöpfendes Auswaschen mit Wasser in an sich bekannter Weise durchgeführt.

Das Entfetten und Trocknen des Rinder-Pericard-Gewebes erfolgt in der Weise, daß die Stücke zunächst mit einer ausreichenden Menge an Aceton bedeckt werden, und über einen Zeitraum von 12 bis 24 h dieses Lösungsmittel 2- bis 6mal erneuert wird. Das so entwässerte Rinder-Pericard-Gewebe wird in eine Soxhlet-Apparatur überführt und in einer erschöpfenden Extraktion restliche Wassermengen und Fettreste entfernt. Nach der Extraktion werden die Rinder-Pericard-Stücke an der Luft getrocknet und anschließend in entmineralisiertem Wasser rehydratisiert (Quellung).

Anschließend wird das Rinder-Pericard-Gewebe in einer automatisch gesteuerten Gefriertrocknungsanlage gefriergetrocknet und sterilisiert.

Das vorstehend beschriebene erfindungsgemäße Herstellungsverfahren ist in besonderer Art dazu geeignet, um ein im medizinischen Bereich einsetzbares Produkt gleichbleibender Qualität zu erzeugen.

Das erfindungsgemäß erhaltene Rinder-Pericard kann als Transplantat oder Implantat auf den verschiedensten Gebieten der Veterinärmedizin oder Humanmedizin, die dem Fachmann wohlbekannt sind, eingesetzt werden. Verwiesen ist in diesem Zusammenhang auf die Firmenbroschüre der Fa. B. Braun Melsungen AG "Lyodura® zum homöoplastischen Ersatz von Körperstrukturen" aus dem Jahre 1978 und die darin genannten sehr zahlreichen Literaturstellen.

Beurteilung der Reißfestigkeit im subkutanen Implantationstest

Die Fig. 1 zeigt beispielhaft, welche Wirkung durch das erfindungsgemäße Verfahren erzielt werden kann.

Die Fig. 1 zeigt den Verlauf der Reißfestigkeit von 10 mm breiten Streifen des erfindungsgemäß erhaltenen Pericard-Materials und im Vergleich zu dem gängigen Marktprodukt Lyodura® nach Einpflanzung unter die Rückenhaut von Ratten (Werte für jeweils 10 Testtiere gemittelt). Hierbei wurden je 50 solcher Streifen implantiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation entnommen, um dann noch die vorhandene Reißfestigkeit zu messen. Die Kurve A wurde mit Pericard ermittelt, das nach dem Verfahren der Erfindung

hergestellt worden war. Die Kurve B wurde zum Vergleich mit Lyodura[®] ermittelt.

Es kann über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen zwischen dem heterologen, erfindungsgemäß hergestellten Material Pericard und dem homologen Material Lyodura[®] kein signifikanter Unterschied bezüglich der Reißfestigkeit gefunden werden, womit gezeigt wurde, daß das heterologe Material ein hervorragender Ersatz für das homologe Material darstellt.

Tabelle

Reißfestigkeit von Pericard- und Durastreifen (10 mm breit) nach Implantation ($n = 10$ pro Gruppe); jeder im Diagramm eingetragene Punkt der Kurve basiert auf 10 Einzelmessungen.

Implantationszeit (Tage)	Pericard gemäß Erfindung (Newton)	Lyodura [®] (Newton)
0	25,0 \pm 9,4 100% \pm 38	23 \pm 10,0 92% \pm 40
1	24,1 \pm 7,9 96% \pm 32	22,8 \pm 9,1 91% \pm 36
4	19,0 \pm 9,0 76% \pm 36	19,2 \pm 8,5 77% \pm 34
7	18,8 \pm 6,3 75% \pm 25	14 \pm 5,1 56% \pm 20
14	10,0 \pm 4,5 40% \pm 18	10,1 \pm 4,5 40% \pm 18
21	6,5 \pm 3,0 26% \pm 12	7,0 \pm 4,5 28% \pm 18

zweite Zeile = Angabe in %
0-Wert Pericard = 100%

Beurteilung der Biokompatibilität im subkutanen Implantationstest

I. An insgesamt 58 Kaninchen und 220 Ratten wurden subkutane Implantationen von Pericard vorgenommen. Untersuchungsparameter waren der pathologisch-anatomische Befund und die histologische Untersuchung der Implantate nach abgestuften Zeitpunkten von 7 Tagen bis zu 12 Monaten.

Die erfindungsgemäßen Pericardimplantate wurden mit lyophilisierter Dura, Lyodura[®] sowie mit acetongetrockneter Dura mater (Tutoplast[®]) verglichen. Es wurden makroskopisch die Entzündungsreaktion und die Implantatbeschaffenheit beurteilt. Anschließend wurden die Proben mit 4%igem Formalin fixiert und einer histologischen Untersuchung unterzogen.

Die Mikroarchitektur des Kollagengerüsts wurde mit nicht implantierten Kontrollen verglichen.

Die histologische Beurteilung der Implantate erstreckt sich auf das Invasionsverhalten von Zellen (Bindegewebszellen, immunokompetente Zellen), die Verbindung Implantat-Empfänger (Einwachsverhalten), Resorption bzw. Vitalisierung des Fremdmaterials und mögliche Abstoßungsreaktionen.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der devitalisierten Pericard-

proben vor der Implantation wurde nachgewiesen, daß diese vollkommen frei von Zellen oder Resten von Zellbestandteilen waren. Dagegen wiesen lyophilisierte und insbesondere lösungsmittelgetrocknete Dura mater noch vereinzelt Kernmaterial auf.

a) Mikroarchitektur der Implantate

Es konnte festgestellt werden, daß die Anordnung der Kollagenfaserstruktur wichtig ist für das Einwanderungsverhalten von Bindegewebszellen.

Straffe, dicht liegende Kollagenfaserbündel (bei lösungsmittelgetrockneter Dura) behindern die Revitalisierung. Bei dem meist als dissoziierte Fasern vorliegenden Pericard und der Lyodura[®] ist die Repopulation mit Zellen aus der Bindegewebsreihe erleichtert.

b) Vitalität des Implantates

Das Pericard-Implantat verhielt sich als Leitschiene, in dessen Zwischenräume die Zellen einwandern:

Bereits nach einer Woche sind in das Implantat reichlich Zellen eingewandert, die sich diffus ausgebreitet haben. Es handelt sich um Fibroblasten und histiozytäre Elemente. Der Vitalitätsindex nimmt von der ersten bis zur 6. Woche hin zu.

c) Infiltration des Implantates mit nicht zur Bindegewebsreihe gehörenden Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen

Das Auftreten dieser Zellen, die quantitativ erstaunlicherweise in geringerer Zahl bei den Pericardproben auftraten als bei den Duraproben, ist nicht mit einer aufkommenden Abstoßungsreaktion gleichzusetzen, sondern als immuninformativer Vorgang aufzufassen. Im Gegensatz zur Invasion mit Fibroblasten und Histiozyten dringen diese Lymphozyten, Makrophagen und Riesenzellen selten tief in das Implantat ein. Makrophagen traten gehäuft auf, wo es zu Blutungen ins Wundbett kam. Die Zellen (Ly., Makr., RZ) wurden ausgewählt und ein Index berechnet, der bei der zum klinischen Einsatz kommenden Pericardprobe (1,43) im Vergleich zu den Duraproben (lyophilisiert: 2,2; acetongetrocknet: 2,32) niedriger lag. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Pericard sehr gut devitalisiert ist, und keine Zell- bzw. Zellkerne mehr enthält, die eventuell immunogen wirken könnten.

d) Akute Endzündungs- und Abstoßreaktionen

Bei der Pericardprobe wurden keine Immunreaktionen nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß das bessere Abschneiden der Pericardproben nicht nur auf das Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen zurückzuführen ist, sondern auch auf den besseren Vitalitätsaspekt, wobei hier die etwas geringere Dicke der Pericardproben eine Rolle spielt.

II. Beurteilung von Biokompatibilität und Funktionsfähigkeit von Pericard als dura mater cerebialis-Ersatz beim Hund

Nach 3 und 6 Monaten post implantationem war das Implantat so gut integriert, daß es von autochthoner Dura nicht mehr zu unterscheiden war (von Fibrozyten revitalisiert und in den Randzonen von Blutgefäßen

durchzogen). Die Innenseite des Implantates ist vom gleichen Zelltyp überzogen wie autologe Dura. Verwachsungen zur Gehirnrinde bestanden nicht.

Dieser Effekt des mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellten Rinder-Pericard-Materials im Vergleich zu handelsüblichen Dura-Materialien wird in der Fig. 2–5 dokumentiert.

Es zeigen:

Fig. 2: Pericard 6 Wochen nach subkutaner Implantation bei der Ratte. Gut revitalisiertes, vollkommen reizloses Implantat mit vitalen Fibroblasten ohne Lymphozyten, Neubildung von Kollagen.

Fig. 3: Lösungsmittelgetrocknete Dura mater 6 Wochen nach subkutaner Implantation bei der Ratte (Vergleich). Lokale Akkumulation von Lymphozyten, im zentralen Bereich noch keine Revitalisierung durch Fibroblasten.

Fig. 4: Pericard 12 Wochen nach subkutaner Implantation bei der Ratte. Gute Integration von Implantat und Wirtsgewebe, keine immunokompetenten Zellen vorhanden.

Fig. 5: Lösungsmittelgetrocknete Dura mater 12 Wochen p.i. (Vergleich). Lokale Akkumulation von Lymphozyten; das Transplantat ist durch die dichte Faserstruktur weitgehend avital.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nachstehend an Hand eines Ausführungsbeispiels zur Herstellung von Rinder-Pericard erläutert.

Ausführungsbeispiel

1. Rohstoff-Gewinnung

Die als Ausgangsmaterial dienenden Herzbeutel (Pericardium) von Rindern werden im Schlachthof nach der üblichen Fleischschau durch einen amtlichen Tierarzt zunächst von anhaftenden Organteilen abgetrennt und grob von Fett- und Bindegewebe befreit. Man erhält auf diese Weise flächige Stücke von der ungefähren Größe 30 × 15 cm und einem Stückgewicht von etwa 1 kg. Diese so vorbereiteten Rinderherzbeutel werden dann in einer mit Eis beschickten Kühltasche vom Schlachthof zur Produktionsstätte transportiert und dort je nach Menge des anfallenden Rohmaterials vor der Weiterverarbeitung bei unter –20°C zwischengelagert.

2. Naßchemische Aufbereitung

Die rohen Pericard-Stücke werden zunächst einzeln mit gereinigtem Wasser gespült – üblicherweise fließend gewässert – um anhaftendes Blut und wasserlösliche Eiweißanteile zu entfernen.

Nach dem Wässern werden alle makroskopisch sichtbaren Reste von Fettgewebe und Basalmembranen entfernt. Anschließend erfolgt eine Behandlung mit 2%iger wäßriger Natronlauge bei Raumtemperatur. Die Pericardstücke (5000 g) verbleiben insgesamt 16 Stunden im Laugenbad (37,5 l). Nach Entnahme erfolgt dann ein ca. 10 Minuten dauernder Spülprozeß in entmineralisiertem Wasser, der so oft wiederholt wird, bis der pH des Spülwassers auf einen Wert unter 8 gesunken ist. Dies ist nach ca. 1 Stunde erreicht. Sollten noch Basalmembranen und Fettreste festzustellen sein, so werden sie auf dieser Prozeßstufe endgültig entfernt.

Die stark gequollenen Pericard-Stücke werden nun in 37,5 l einer 10%igen wäßrigen Kochsalzlösung transferiert, um den für die weiteren Prozeßschritte erforderlichen Quellzustand (partielle Entquellung) einzustellen.

Die NaCl-Behandlung wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Es schließt sich ein Spülprozeß mit entmineralisiertem Wasser an.

Um störende Schwermetallionen und etwaige Kalk-einlagerungen aus dem Pericardgewebe zu entfernen, erfolgt nun eine Behandlung mit 37,5 l schwach alkalisch eingestellter EDTA-Lösung. Zusammensetzung pro 100 ml: 0,3 g. Anschließend wird wie in den vorausgegangenen Prozeßschritten mit entmineralisiertem Wasser gespült, um überschüssigen Komplexbildner zu entfernen und gleichzeitig den pH auf einen Wert von 8,5 zu bringen. Die nun folgende Behandlung mit 1 mal 37,5 l Acetat-Puffer (pH = 4,8 Zusammensetzung pro 100 ml: 0,01 mol/100 ml Na-acetat, 3H₂O, 59 Volumen-Teile; 0,01 mol/100 ml Essigsäure, 41 Volumen-Teile) dient dem Zweck, alle etwa noch im Pericard-Gewebe verbliebenen Laugenreste abzapffern und ein schwach saures Milieu für den späteren Bleichprozeß vorzubereiten. Überschüssige Puffersubstanzen werden wie vorstehend beschrieben durch Spülen mit entmineralisiertem Wasser entfernt.

3. Oxidative Bleichung

Im Anschluß an die naßchemische Aufbereitung werden die Pericard-Stücke einer einstündigen oxidativen Bleichung in 37,5 l 1,5%iger Wasserstoffperoxid-Lösung unterzogen. Wie alle vorausgegangenen Behandlungsschritte wird auch der Bleichprozeß bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf diese Weise wird einerseits die Effizienz der Reinigungsoperationen sichergestellt, andererseits aber eine Beeinträchtigung des kollagenen Gewebes vermieden.

4. Auswaschen

Zur Entfernung überschüssigen Reagenzes wird anschließend mit entmineralisiertem Wasser gemäß dem üblichen Programm gespült.

5. Entfettung

Die gespülten Rinder-Pericard-Stücke wurden in eine solche Menge Aceton gelegt, daß das Rinder-Pericard-Gewebe vollständig mit Aceton überdeckt war.

Innerhalb von 8 Stunden wurde das Lösungsmittel dreimal erneuert. Die so entwässerten Rinder-Pericard-Gewebe wurden daraufhin in eine Soxhlet-Apparatur überführt und ca. 7 Stunden mit Aceton extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Pericard-Stücke an der Luft getrocknet und anschließend in einem Transport-Gefäß mit entmineralisiertem Wasser rehydratisiert.

6. Gefriertrocknung

Die Trocknung erfolgte in einer automatisch gesteuerten Gefriertrocknungsanlage. Die Gefriertrocknung verläuft im einzelnen wie folgt:

Temperaturabsenkung auf +1°C, Temperaturabsenkung auf –40°C, Einschalten des Vakuums, Aufheizung der Steilplatten auf +40°C und Trocknung bei vollem Vakuum.

7. Sterilisieren

Die Sterilisierung erfolgt durch Strahlensterilisation mit 2,5 Mrad.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Rinder-Pericard-Material durch Aufarbeitung von rohem Rinder-Pericard-Gewebe durch eine naßchemische Aufbereitung, oxidative Bleichung, Auswaschen, Entfetten, Trocknen und Sterilisieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß die naßchemische Aufbereitung des Rinder-Pericard-Gewebes folgende Schritte umfaßt:
 - a) Wässern des Rinder-Pericard-Gewebes,
 - b) mechanische Entfernung von Fettgewebe und Basalmembranen von der Oberfläche des Rinder-Pericard-Gewebes,
 - c) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit verdünnter, wäßriger, basischer Lösung,
 - d) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von restlicher Base,
 - e) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit verdünnter wäßriger Natriumchloridlösung,
 - f) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von Natriumchloridresten,
 - g) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit einem Komplexierungsmittel,
 - h) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von Komplexierungsmittelresten,
 - i) Behandlung des Rinder-Pericard-Gewebes mit einem sauren Puffersystem und
 - j) Spülen des Rinder-Pericard-Gewebes mit entmineralisiertem Wasser zur Entfernung von sauren Puffersystemresten
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man im Anschluß an Verfahrensschritt d) vor Verfahrensschritt e) die Maßnahme nach Merkmal b) wiederholt.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die naßchemischen Aufbereitungsschritte a) und c) bis j) bei Raumtemperatur, also zwischen 15°C und 25°C, durchgeführt werden.
4. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Behandlung im Verfahrensschritt c) mit einer verdünnten, wäßrigen, basischen Lösung von Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Lithiumhydroxid und/oder Natriumcarbonat über einen Zeitraum von bis zu 16 Stunden durchführt und vorzugsweise hierzu eine 2 bis 2,5 Gew.-%ige Natriumhydroxidlösung verwendet.
5. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Behandlung im Verfahrensschritt e) mit einer wäßrigen, 10 bis 11 Gew.-%igen Natriumchloridlösung durchführt.
6. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Behandlung im Verfahrensschritt g) mit einer verdünnten wäßrigen Dinatrium-EDTA-Lösung, welche vorzugsweise 0,3 bis 0,5 Gew.-%ig ist, in einem alkalisch-wäßrigen Medium ($\text{pH} \geq 8$) durchführt.
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Spülung im Verfahrensschritt h) so lange fortsetzt, bis man einen schwach-alkalischen pH-Wert von bis zu 8,5 erreicht hat.
8. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Behandlung im Verfah-

rensschritt i) mit einem Acetat-Puffersystem mit einem pH-Wert von 4,5 bis 6, vorzugsweise 4,8 ausführt.

9. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die oxidative Bleichung mit Wasserstoffperoxid enthaltenden wäßrigen Lösungen mit einem Gehalt von weniger als 2 Gew.-%, vorzugsweise um 1,5 Gew.-% vornimmt.

10. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man das Entfetten und Trocknen durch Aceton-Behandlung bei Raumtemperatur, Soxhlet-Extraktion mit Aceton, Rehydratisierung und Gefriertrocknung durchführt.

11. Verwendung der gemäß Ansprüchen 1 bis 10 erhaltenen Rinder-Pericard-Materialien zur Verwendung als Transplantate und Implantate in der Human- und Veterinärmedizin.

Hierzu 5 Blatt Zeichnungen

— Leerseite —

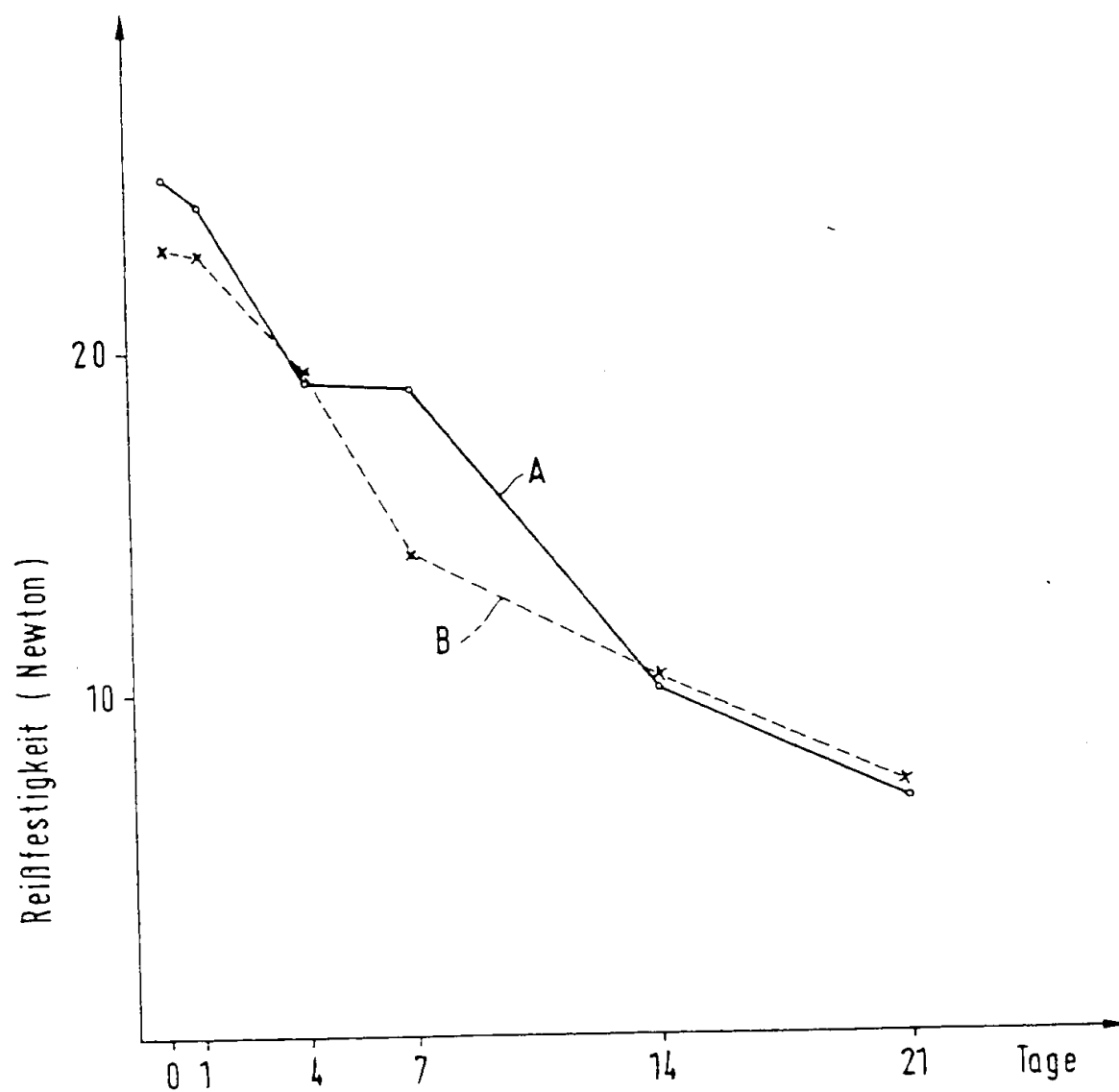


FIG. 1

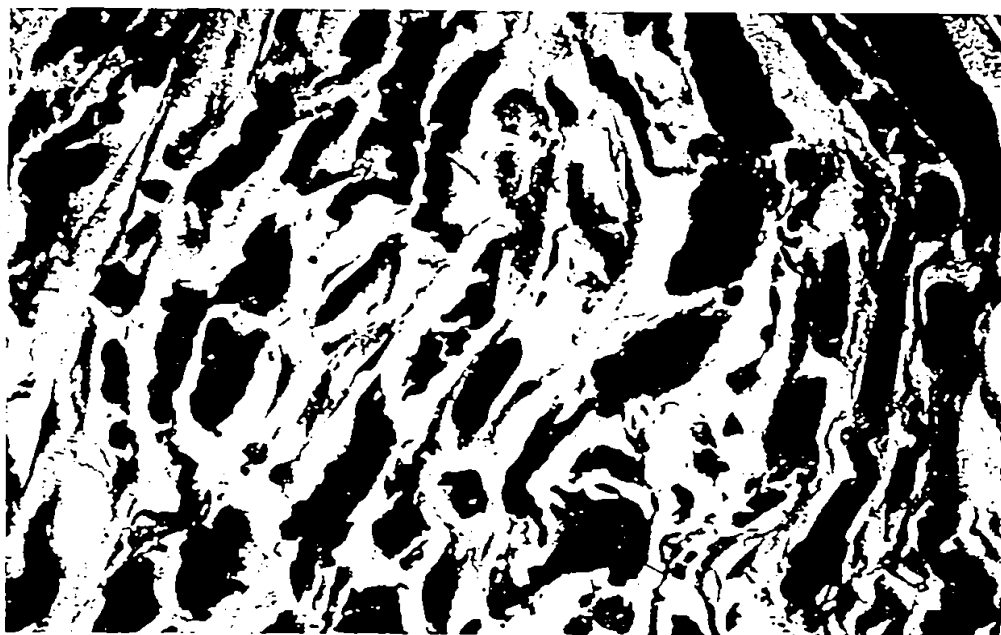


Fig. 2

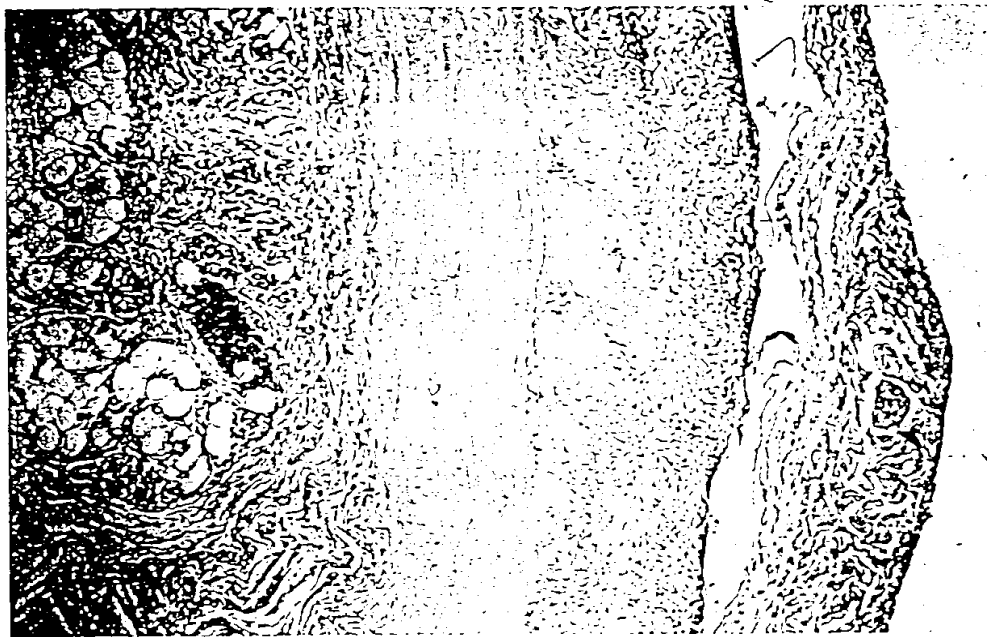


Fig. 3

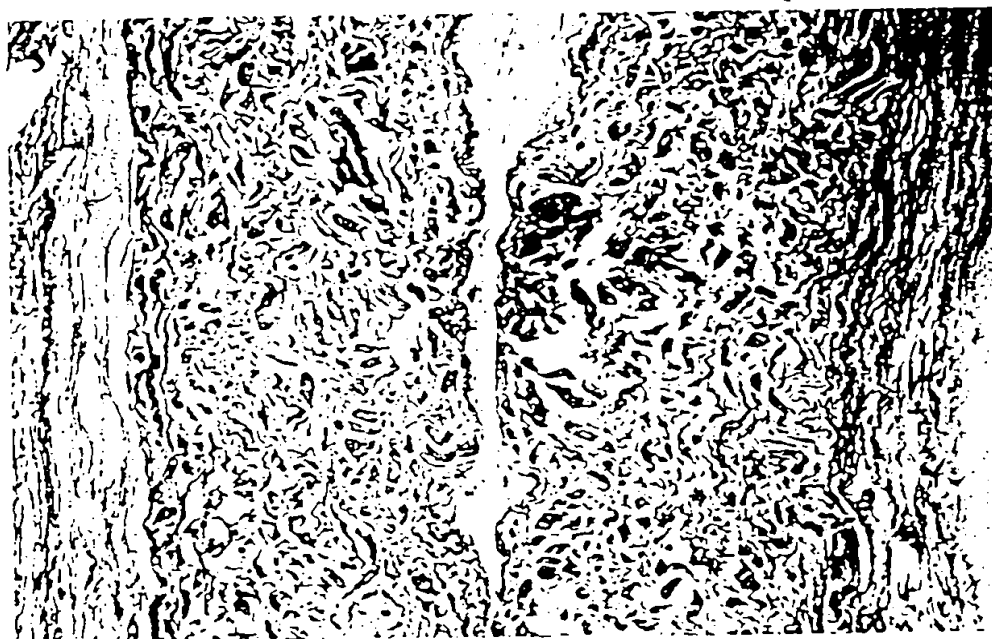


Fig. 4



Fig. 5